

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 430 945

A2

DEMANDE
DE CERTIFICAT D'ADDITION

(21)

N° 78 20878

Se référant : au brevet d'invention n. 74.12290 du 8 avril 1974.

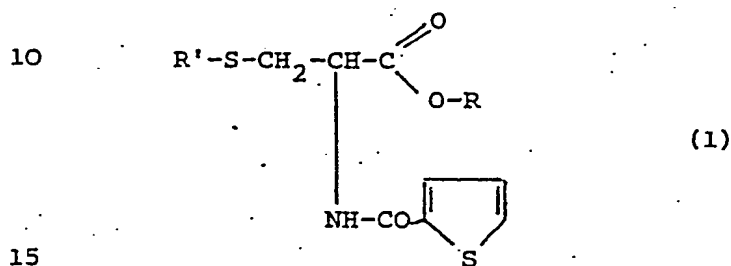
-
- (54) Nouveaux dérivés de la cystéine, leur procédé de fabrication et leur application en thérapeutique.
- (51) Classification internationale. (Int. Cl 3) C 07 D 333/38; A 61 K 31/38.
- (22) Date de dépôt 12 juillet 1978, à 15 h 53 mn.
- (33) (32) (31) Priorité revendiquée :
-
- (41) Date de la mise à la disposition du public de la demande B.O.P.I. — «Listes» n. 6 du 8-2-1980.
-
- (71) Déposant : Société anonyme dite : LABORATOIRES CHAUVIN-BLACHE, résidant en France.
- (72) Invention de : Le Hao Dong et Claude Coquelet.
- (73) Titulaire : *Idem* (71)
- (74) Mandataire : Cabinet Kessler/Ile de France, 14, rue de Londres, 75009 Paris.

Certificat(s) d'addition antérieur(s) :

La demande de brevet principale a pour objet de nouveaux dérivés de la cystéine, leur procédé de fabrication et leur application en thérapeutique.

Plus précisément, ces dérivés de la cystéine sont la N-(α -thénoyl) L-cystéine et ses esters.

La présente invention a pour objet de nouveaux composés du même type, qui répondent à la formule générale



dans laquelle

- R représente un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle inférieur comprenant de 1 à 8 atomes de carbone, et
- R' représente un radical α -thénoyle ou un radical carboxyméthyle.

Les composés de formule (1) sont préparés de la manière suivante :

25 Lorsque R' représente un radical α -thénoyle, les composés sont issus de la réaction entre la N-(α -thénoyl) L-cystéine et le chlorure d' α -thénoyle.

Le procédé de préparation de la N-(α -thénoyl) L-cystéine, utilisée comme matière de départ, est décrit dans 30 la demande de brevet principale.

Lorsque R' représente un radical carboxyméthyle, les composés de formule (1) sont issus de la réaction entre la S-carboxyméthyl L-cystéine et le chlorure d' α -thénoyle.

Les préparations suivantes sont décrites à titre non 35 limitatif, pour illustrer l'invention.

EXEMPLE 1

Ester méthylique de la N,S-di(α -thénoyl) L-cystéine.

On dissout, en agitant et tiédissant, 0,2 mole d'ester 40 méthylique de N-(α -thénoyl) L-cystéine dans 400 ml de

benzène anhydre, puis ajoute successivement 0,25 mole de triéthylamine et 0,2 mole de chlorure d' α -thénoyl au mélange réactionnel. On porte ensuite à reflux pendant 12 heures.

- 5 On essore à chaud le chlorhydrate de triéthylamine formé et lave successivement la phase organique par l'eau, par une solution de carbonate de sodium, par l'acide chlorhydrique, puis de nouveau par l'eau. On décolore la solution benzénique au moyen de noir animal, la sèche sur sulfate de sodium et filtre. On évapore sous vide le benzène et triture le résidu dans l'éther. On essore les cristaux peu colorés qui se séparent, les sèche sous vide et les recristallise dans l'alcool à 95° obtenant ainsi des cristaux blancs constitués par l'ester méthylique de la N,S-di(α -thénoyl) L-cystéine attendu.
- 10
- 15

Rendement 70 %.

Point de fusion : 102 - 103°C au banc Köfler

Le produit est soluble dans le chloroforme, le benzène et l'acétone et insoluble dans l'eau, l'éther et le pentane.

20

- RMN (CDCl_3) :

δ CH_3	:	3,83 ppm (singulet)
δ CH_2	:	3,67 ppm (doublet)
δ CH	:	5,0 ppm (octet)
δ NH	:	7,15 ppm
δ protons aromatiques	:	massif de 7,05 à 7,92 ppm

25

- IR (KBr) : pas de bande SH à 2530 cm^{-1}

30

EXEMPLE 2

S-carboxyméthyl N-(α -thénoyl) L-cystéine

- On dissout 0,1 mole de S-carboxyméthyl L-cystéine dans une solution aqueuse contenant 0,3 mole de carbonate de sodium et 200 ml d'eau distillée. On refroidit le mélange réactionnel à 5°C puis y ajoute, goutte à goutte, en une heure, tout en agitant et en maintenant une température maximale de 5°C, une solution de 0,1 mole de chlorure d' α -thénoyl dans 150 ml d'éther.
- 35

Une fois l'addition terminée, on poursuit l'agitation 1/2 heure à 5°C, puis 2 heures à la température ambiante.

On décante, lave la phase aqueuse par l'éther et l'acidifie avec de l'acide chlorhydrique puis extrait, à l'aide d'éther, la S-carboxyméthyl N-(α -thénoyl) L-cystéine attendue, tout en relarguant au chlorure de sodium.

On sèche les extraits étherés sur sulfate de sodium et les évapore sous vide, puis purifie le produit brut par recristallisation dans l'acétate d'éthyle, obtenant ainsi des cristaux blancs.

Rendement : 70 %.

Point de fusion : 76-78°C au banc Köfler.

Le produit est soluble dans l'eau et l'acétone et peu soluble dans l'éther, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le méthanol.

- RMN (diméthylsulfoxyde) : δ NH : 9,5 ppm (doublet)
 δ protons aromatiques :
massifs de 7,12 à 8,07 ppm.

La structure du composé est également confirmée par son spectre IR.

Les composés de formule (I) ont été soumis à une étude qui a permis de mettre en évidence les propriétés pharmacologiques ci-après :

Les recherches entreprises ont eu pour but de vérifier l'activité des composés de formule (I) sur la bronchite expérimentale du rat E.O.P.S. exposé aux vapeurs sulfureuses (Quevauviller et Vu Ngnoc Huyen), (C.R. Soc. Biol., 1966, n° 10, pp. 1845-1848).

On a ainsi comparé l'effet des composés dont la préparation est décrite aux exemples 1 et 2 et auxquels on se référera, dans la suite, par composés 1 et 2, à celui de la S-carboxyméthyl-cystéine (en abrégé SCMC), prise comme produit de référence.

Le tableau 1 ci-après indique la composition des lots de rats et le traitement auquel ils ont été soumis.

TABLEAU 1

N° de lot	Nombre de rats	Exposition au SO ₂	Traitement	
			Composé	Dose administrée mg/kg
1	10	oui	-	-
2	12	oui	n° 1	360
3	8	oui	n° 2	400
4	9	oui	SCMC	250
5	13	non	-	-

Les résultats expérimentaux peuvent se rattacher à deux domaines distincts de déterminations :

- : Mesures biophysiques = gaz du sang.
- . Confections de préparations histologiques avec le poumon gauche de chaque animal, coloration par le bleu Alcian.

RESULTATS

1 - Les gaz du sang

Parmi les résultats obtenus, n'ont été retenus, pour l'analyse statistique, que les pO₂, pCO₂ et la saturation en O₂ (S_A O₂).

Les valeurs moyennes sont consignées dans le tableau 2.

TABLEAU 2
GAZ DU SANG - VALEURS MOYENNES

	N	pCO ₂	pO ₂	S _A O ₂
Lot n° 1	10	41,75	67,8	82,2
Lot n° 2	12	36,7	77,9	95,3
Lot n° 3	8	37,7	68,8	88,8
Lot n° 4	9	36,7	69,8	89,4
Lot n° 5	13	35,5	80,3	94,5
F ₄₇ expérimental de l'an-var		1,49 N.S.	1,2 N.S.	0,82 N.S.

N.S. = non significatif.

Ce tableau a permis de réaliser une analyse de la variance qui a pour but de tester l'égalité des moyennes dans leur ensemble. Cette analyse ne fait ressortir aucune

5 différence significative.

Cependant, il est intéressant de noter que, dans chaque colonne, c'est-à-dire pour chaque paramètre considéré, les valeurs extrêmes sont détenues par les deux lots témoins et que les valeurs moyennes de chaque lot traité se situent

10 dans l'intervalle déterminé par le lot témoin négatif et par le lot témoin SO_2 .

Pour les trois paramètres étudiés, le meilleur score ou meilleur résultat est obtenu avec le composé 1 qui se révèle supérieur au composé 2, à la SCMC et aux témoins

15 SO_2 . Le composé 1 obtient même, pour la $S_{A_2}O_2$, un résultat légèrement supérieur aux témoins négatifs : 95,3 % contre 94,5 %.

2 - Etude histologique

20 Les déterminations réalisées grâce à l'examen histologique des lames, sont de type plus qualitatif que quantitatif.

Ont été examinés successivement :

- 25 . l'état des alvéoles (tableau n° 3 qui est un tableau à 3 colonnes : normal, \pm lâche, distendu),
- . le nombre de cellules à mucus (tableau 4 à deux classes, peu de cellules ou beaucoup de cellules),
- . l'épaisseur de l'épithélium bronchique (tableau 5, divisions du micromètre avec analyse de la va-

30 riance).

a - Etat des alvéoles

TABLEAU 3

HISTOLOGIE : Bleu Alcian pH 2,45

35

Etat des alvéoles pulmonaires - Rats.

	ETAT DES ALVEOLES		
	Normal	+ lâche	Distendu
Lot n° 1	0%	30%	70%
Lot n° 2	41,7%	33,3%	25%
Lot n° 3	25%	12,5%	62,5%
Lot n° 4	33,3%	22,2%	44,5%
Lot n° 5	76,9%	23,1%	0 %

Le tableau ci-dessus est un tableau de contingence à 3 colonnes et 5 lignes que l'on ne peut analyser par un test classique du χ^2 en raison de la faiblesse des effectifs.

La simple lecture du tableau indique que l'état des alvéoles est normal dans 76,9% des cas chez les animaux témoins négatifs alors que le résultat est de 0% chez les animaux témoins SO_2 . La colonne n° 1 montre que le composé 1 obtient le meilleur résultat en étant le plus proche des témoins vrais. La colonne n° 2 ne présente pas d'intérêt par elle-même. La colonne n° 3 attire le même type de commentaire que la colonne n° 1 en indiquant que 70% des animaux témoins bronchiteux présentent un état alvéolaire distendu ; à l'inverse, les animaux qui sont restés dans l'animalerie, c'est-à-dire qui n'ont pas été exposés aux vapeurs de SO_2 , ne présentent pas de distension alvéolaire.

A nouveau, le traitement par le composé 1 a entraîné un ralentissement de la distension alvéolaire qui place le lot n° 2 (25%) le plus près des animaux témoins du lot n° 5 (0%).

b - Nombre de cellules à mucus

TABLEAU 4

HISTOLOGIE : Poumon de rats.

	Cellules à mucus	
	peu	beaucoup
Lot n° 1	50%	50%
Lot n° 2	75%	25%
Lot n° 3	62,5%	37,5%
Lot n° 4	66,7%	33,3%
Lot n° 5	76,9%	23,1%

Le tableau ci-dessus est un tableau à deux colonnes et cinq lignes que l'on ne peut analyser par le test du χ^2 en raison de la faiblesse des effectifs calculés, souvent inférieur à 5.

5 L'examen des valeurs indiquées montre que les deux pourcentages extrêmes sont tenus par les deux lots témoins et que les chiffres les plus intéressants entre les deux extrêmes sont à mettre à nouveau au compte du composé 1.

10 c - Epaisseur de l'épithélium bronchique

Les résultats regroupés dans le tableau ci-dessous sont de nature quantitative et permettent précisément une analyse statistique classique par l'analyse de variance. Rappelons que ce test est destiné à comparer 15 l'égalité des moyennes prises dans leur ensemble. Ainsi l'étude a porté sur les valeurs moyennes de l'épaisseur de l'épithélium bronchique mesuré à l'aide d'un micromètre placé dans l'oculaire d'un microscope "panoramique".

20

TABEAU 5

Les valeurs indiquées correspondent à des divisions au micromètre.

Une division égale deux microns.

25

HISTOLOGIE : Poumons de rats.

Epaisseur épithélium bronchique.

	EPAISSEUR MOYENNE \pm ECART TYPE
Lot n° 1	13,6 \pm 4,7
Lot n° 2	12,6 \pm 5,5
Lot n° 3	17,0 \pm 5,6
Lot n° 4	12,1 \pm 5,4
Lot n° 5	9,7 \pm 3,0

$$F_{47}^4 = 2,956 \quad (\text{significatif à } 5\%).$$

Contrairement à ce qui avait été observé dans les deux tableaux précédents, une des deux valeurs extrêmes est détenue non plus par les animaux témoins SO_2 du lot n° 1, mais par les animaux du lot n° 3 (composé 2).

5 L'autre valeur extrême, la moins pathologique, est toujours enregistrée chez les animaux témoins négatifs du lot n° 5. Parmi les traitements étudiés, le meilleur score est réalisé par la S-carboxy-méthyl-cystéine qui devance de très peu le traitement par le composé 1 (12,1 et 12,6).

10 La valeur du F expérimental de l'analyse de variance ressort à 2,956. Lorsque l'on compare ce chiffre à celui de la table de F théorique, on constate que les moyennes sont différentes de façon significative au seuil de 5%. De même, la comparaison des moyennes des lots 1 et 5
15 par le test T de Student, atteint le seuil de signification de 5%.

Il ressort de l'étude consacrée, d'une part, aux variations des valeurs des gaz du sang et, d'autre part, aux examens histologiques du poumon gauche des animaux utilisés,
20 que le traitement par voie orale par le composé 1 protège les animaux des effets néfastes des vapeurs sulfureuses.

De plus, aux doses utilisées dans l'essai, le traitement par le composé 1 semble présenter une supériorité d'action comparativement à la S-carboxy-méthyl-cystéine.

25 Les composés selon l'invention ont également fait l'objet d'une étude toxicologique.

TOXICITE AIGUE

La toxicité aiguë, par voie orale, des composés a été étudiée chez le rat WISTAR et la souris SWISS (élevage traditionnel).

- 5 Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 6 ci-après.

TABLEAU 6

Composés	ANIMAUX			Dose mg/kg per os	% mort après 7 jours
	Race et sexe	Poids moyen	Nombre		
2	RATS ♂	120 g	10	5.000	0
1	RATS ♂	127 g	10	7.000	0
2	RATS ♀	123 g	10	5.000	0
1	RATS ♀	125 g	10	7.000	0
2	SOURIS ♂	18,4 g	10	8.000	10%
1	SOURIS ♂	19,1 g	10	5.000	0
2	SOURIS ♀	17,9 g	10	8.000	10%
1	SOURIS ♀	18,1 g	10	5.000	0

La lecture du tableau ci-dessus permet de constater une absence quasi-totale de toxicité des composés selon l'invention.

10 TOXICITE SUBCHRONIQUE

Les essais ont été conduits chez le rat WISTAR des deux sexes provenant d'un élevage traditionnel.

Les administrations ont été effectuées par voie orale, quotidiennement, pendant 4 semaines.

- 15 Trois doses ont été retenues :

0,500 g/kg	10 rats mâles	+	10 rats femelles
1,000 g/kg	"	+	"
1,500 g/kg	"	+	"

Les examens nécropsiques et les déterminations bio-chimiques et hématologiques ainsi que les études microscopiques n'ont fait apparaître aucun signe de toxicité pour les produits à l'étude.

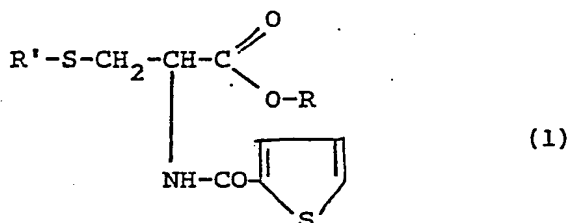
5 Il ressort des résultats rapportés ci-dessus que les composés de formule (1) exercent un effet protecteur sur les bronches et que leur toxicité, extrêmement faible, est tout à fait compatible avec un usage en thérapeutique.

10 On peut donc envisager leur utilisation dans toutes les affections des voies respiratoires, telles que sinusites, rhinites ou bronchites. A cette fin, ils pourront être administrés par voie orale (comprimés, gélules ou sirop), ou par voie rectale à des doses journalières de 1 à 3 g, ou sous forme d'aérosol en solution de 1 à 3 %.

15 L'invention ayant maintenant été exposée et son intérêt justifié sur des exemples détaillés, la demanderesse s'en réserve l'exclusivité pendant toute la durée du brevet principal, sans limitation autre que celle des termes des revendications ci-après.

REVENDICATIONS

1. A titre de produits industriels nouveaux, les dérivés de la N-(α -thénoyl) L-cystéine de formule



dans laquelle

- R représente un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle inférieur comprenant de 1 à 8 atomes de carbone, et

15 - R' représente un radical α -thénoyle ou un radical carboxy-méthyle

2. Ester méthylique de la N,S-di(α -thénoyl) L-cystéine.

3. S-carboxy-méthyl N(α -thénoyl) L-cystéine.

20 4. Procédé de préparation des dérivés selon la revendication 1 dans lesquels le radical R' représente un radical α -thénoyle, caractérisé en ce qu'il consiste à accomplir une réaction entre la N-(α -thénoyl) L-cystéine et le chlorure d' α -thénoyle.

25 5. Procédé de préparation des dérivés selon la revendication 1 dans lesquels le radical R' représente un radical carboxy-méthyle, caractérisé en ce qu'il consiste à accomplir une réaction entre la S-carboxy-méthyl L-cystéine et le chlorure d' α -thénoyle.

30 6. A titre de médicaments utilisables en particulier pour le traitement des affections des voies respiratoires, les dérivés selon l'une quelconque des revendication 1 à 3.